动 物 学 研 究 2009，Jun. 30(3): 267−275 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.03267

$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠突变基因的精确定位及克隆鉴定

吴宝金[1,*]，茅慧华[2,3]，曾咏梅[2]，般黎静[2]，般筱舒[2]，杨伟伟[2]，
亢晓冬[1]，刘桂杰[1]，俞利平[1]，顾美儿[1]，吴培林[1]

（1. 杭州师范大学 实验动物科学实验室，浙江 杭州 310036； 2．扬州大学 比较医学中心，江苏 扬州 225001；
3. 东南大学 遗传中心，江苏 南京 210009）

摘要：$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠是本实验室培育的呈单基因隐性遗传的突变系小鼠，突变基因已被初步定位于第9号染色体末端；为了精确定位并鉴定$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠的突变基因，将(C57BL/6J×$snthr^{-1Bao}$)F_1代互交繁殖F_2代小鼠4400余只，其中稀毛小鼠1100只，并在2个微卫星、35个可能的简单序列重复标记（simple sequence repeat，SSR）及3个酶切扩增多态性序列（c1eaved amplified polymorphic sequences，CAPS）标记中找到4个合适的基因组标记。利用这些标记及F_2代稀毛小鼠将突变基因精确定位到第9号染色体距着丝粒117.763 kb及119.129 kb之间1.367 Mb的范围内，在其间的21个基因中确定*Plcd1*为稀毛突变的强力候选基因。通过对基因组的直接测序，发现$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠基因组上有一个14883 bp的缺失，这一缺失包含了*Plcd1*基因的4—15号外显子及*Vill*基因的10—19号外显子。推测极可能是*Plcd1*基因缺失导致$snthr^{-1Bao}$小鼠出现稀毛表型。

关键词：$snthr^{-1Bao}$ 稀毛小鼠；精确定位；*Plcd1*；*Vill*；缺失
中图分类号：Q959.837; Q954.4; Q344 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)03-0267-09

Fine Mapping and Identifying the Mutation Gene of $snthr^{-1Bao}$ Scant Hair Mouse

WU Bao-jin[1,*], MAO Hui-hua[2,3], ZENG Yong-mei[2], YIN Li-jing[2], YIN Xiao-shu[2], YANG Wei-wei[2], KANG Xiao-dong[1], LIU Gui-jie[1], YU Li-ping[1], GU Mei-er[1], WU Pei-lin[1]

（1. *Laboratory of Experimental Animal, Hangzhou Normal University, Hangzhou* 310036, *China*; 2. *Comparative Medicine Center of Yangzhou University, Yangzhou* 225009; 3. *Genetic Research Center of Southeast University, Nanjing* 210009, China）

Abstract: To finely map and identify the mutant gene of $snthr^{-1Bao}$ mouse whose mutation gene showing single gene recessive heredity was mapped on the terminal side of chromosome 9，F_2 mice bred through (C57BL/6J ×$snthr^{-1Bao}$)F_1 mice intercrossing and the polymorphisms of 2 microsetallites, 35 SSRs presumed by computer and 3 SNPs chosen and tested were for fine mapping. RT-PCR amplifying cDNA combined with genomic sequence to identify mutation after affirming candidate gene. Based on genomic markers D9Mit151, a new SSR，two SNPs (rs8254361 and rs30195705) and 1100 F_2 scant hair mice selected from over 4400 F_2 mice, the mutant gene was narrowed down to a 1.367Mb region between 117.762kb and 119.129kb from the centromere on the chromosome 9 and *Plcd1*was the primary candidate gene. Genomic sequence revealed there was a 14883bp deletion and such deletion destructed the *Plcd1* and *Vill.* The 14 883 bp genomic deletion covering subtotal *Plcd1*and *Vill,* more likely the *Plcd1,* is responsible for the abnormal phenotype of $snthr^{-1Bao}$ mouse.

Key words: $snthr^{-1Bao}$ mouse; Fine mapping; *Plcd1*; *Vill*; Deletion

具有疾病特征的突变系小鼠模型在人类疾病机制的研究中发挥了非常重要的作用，其中部分小鼠模型是由于其皮肤的显著异常引起了研究者的注意，如裸小鼠、无毛小鼠等（Sundberg et al, 1999; Zlotogorski et al, 2001; Flanagan et al, 1966; Sundberg et al, 2001; Frank et al, 1999）；而决定皮肤

收稿日期：2009-02-25；接受日期：2009-04-10
基金项目：国家自然科学基金面上项目（30670231；30400266）
*通讯作者 (Corresponding author)，Tel: 0571-28868852, E-mail: baojinwu@163.com
第一作者简介：吴宝金，40 岁，博士学位，副教授，研究方向为人类疾病动物模型与分子遗传学

毛发正常发育及功能的基因通常在也其他器官系统中发挥着重要作用，深入研究这些基因在皮肤毛囊发育中的分子机制往往为多种器官系统的正常发育或疾病机制的研究提供线索；但是只有鉴定这些模型小鼠的遗传基础，才能真正找到人类同源疾病，确立某种小鼠作为特定人类疾病的模型价值。无毛突变小鼠曾经作为人类正常皮肤的模型使用，但是当人类的丘疹状无毛症被确定为同一基因所致的同源疾病，这个用法被彻底否定(Sundberg et al, 1999; Zlotogorski et al, 2001)。裸小鼠自1966年被第一次报道，直到联合免疫缺陷动物被成功培育之前，它一直是标准的异种移植的受体模型，然而直到30年后裸基因被鉴定，对应的人类同源疾病才被确认(Flanagan et al, 1966; Sundberg et al, 2001; Frank et al, 1999)。另一方面，随着基因组科学的发展，一旦鉴定突变基因，将对特定基因的功能研究有很好的指导和启示作用。所以，在一定程度上，鉴定突变小鼠遗传学的分子基础，是小鼠模型开发及突变基因功能研究的前提和基础。

*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠是本实验室在ENU（乙酰基亚硝基脲）诱变小鼠的过程中获得的一种呈隐性遗传的突变种小鼠，遗传背景为DBA/2J(Mao et al, 2004)，其最显著的可见表型为被毛稀疏，是由于皮肤过度角化，毛发无法穿出皮肤，导致无菌性炎症并瘢痕形成(Wu et al, 2008)。本研究组通过基因组扫描的办法，利用126只F_2代小鼠已将突变基因定位于小鼠第9号染色体距着丝粒71 cM处，突变基因与D9Mit243间有20例交换，而与D9Mit18间无交换(Mao et al, 2005)。该小鼠已经被小鼠基因组数据库（Mouse Genome Informatics, MGI）收录（http://www.nc bi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?taxid=10090&contig=NT_039482.7&gene=Plcd1&lid=18799）。要进一步开发*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠的模型价值、研究其突变基因功能，鉴定该种小鼠的遗传基础非常必要。本研究大量繁殖定位用F_2代小鼠[（C56BL/6J×*snthr^{-1Bao}*）F_1互交]4 400余只，其中稀毛小鼠1 100只；在突变基因附近筛选到4个分子标记，在将突变基因定位到1.367Mb范围并确定候选基因的基础上，通过对基因组直接测序鉴定出*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠的遗传基础为9号染色体远端14883 bp的巨大缺失，涉及*Plcd1* 及*Vill*基因。具体工作如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠，雌雄各40只；成年C57BL/6J（以下简称B6）雌雄各40只。实验小鼠为清洁级，由扬州大学比较医学中心提供。动物生产许可证：SCXK（苏）2002-0009，使用许可证：SCXK（苏）2002-0045。动物饲养在屏障动物房内，温度控制在(23±2)℃，湿度控制在(55±5)%，饲料采用Co_{60}照射，自由采食和饮水，室内照明采用12/12h明暗交替。

动物饲养设备由苏杭实验动物设备厂生产；PCR仪，Biometra公司T Gradient Thermocycler型；电泳仪，北京仪器厂DYY-III2型，大连竞迈生物科技有限公司，型号Jim-X；凝胶成像系统，天能科技（上海）有限公司，型号GIS-2008；PCR产物测序委托上海生工进行。

1.2 方 法

1.2.1 基因组标记的筛选 通过查询小鼠微卫星数据库（http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/stsinfo?database=mouse）、小鼠SNP数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=SNP&term=txid10090%5Borgn%5D）及计算机寻找可能的SSR标记（http://danio.mgh.harvard.edu/mouseMarkers/musssr.html）等方法，在初步定位的范围附近寻找合适的标记，该标记要求在B6小鼠及DBA/2J小鼠（以下简称D2小鼠）之间有多态性。对于微卫星及SSR标记直接合成引物扩增，PCR产物经3%琼脂糖或12%聚丙烯酰胺电泳后区分多态性；对于SNP标记，合成引物后PCR扩增局部基因组，扩增产物采用合适的内切酶酶切，酶切产物电泳后区分多态性。

1.2.2 繁殖定位用F_2代小鼠及基因组DNA的准备 将*snthr^{-1Bao}*突变小鼠与B_6小鼠配种得到带有突变基因的F_1代小鼠（无表型），再将F_1代小鼠随机互交得到F_2代小鼠，将具有稀毛表型的F_2代小鼠用于定位实验。采用蛋白酶K消化、酚氯仿法提取有突变表型的F_2代小鼠基因组DNA(Joseph et al, 2002)，备用。

1.2.3 精确定位及候选基因筛选 鉴定每个F_2代标本在每个基因组标记点的基因型，分析该标本突变基因与基因组标记以及各基因组标记之间的连锁交换情况，依据三点测试原理将突变基因定位在两个基因组标记之间。查询NCBI小鼠基因组数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/

mouse/，版本号Build 37），逐一分析基因组位于定位区间内的所有基因，分析这些基因的表达部位及功能，与毛发生长稀疏相关的基因被确认为候选基因。

1.2.4　RT-PCR扩增候选基因　分别取 7 日龄雄性*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠和对照组雄性D2 小鼠各 3 只，取它们的背部皮肤，剪碎后置于研磨器中。按照TRI说明书进行抽提总RNA (MBI Fermentas)，取抽提的总RNA溶液进行RT反应，反应体系及反应条件依据产品说明书进行(MBI Fermentas)；获得的cDNA产物用作PCR模板或－20℃保存备用。

1.2.5　基因组DNA的提取及测序鉴定　取雄性*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠和雄性D2 小鼠各 3 只，采用蛋白酶K消化、酚氯仿法提取基因组DNA(Joseph et al, 2002)，备用。依据候选基因位置，先后合成数十条引物覆盖候选基因对应的基因组局部区域，分别用相邻引物PCR扩增基因组标本，将PCR产物测序结果与小鼠基因组序列数据库比对，确认突变。

2　结　果

2.1　F_2代小鼠繁殖、标记筛选与精确定位

本实验实际繁殖F_2代小鼠 4 400 余只，其中筛查出且在本实验中使用的具有稀毛表型的F_2代小鼠 1 100 只，这部分小鼠的基因组DNA标本用于PCR扩增并进行基因型分析。

先前定位的结果是稀毛基因与D9Mit18 位点紧密连锁(无交换)，为了便于限定突变基因的绝对位置，在大量繁殖F_2代稀毛小鼠的同时，希望在突变基因两侧各得到一个在定位品系之间有多态性的基因组标记。本实验先后进行了 4 次标记筛选：第一次在D9Mit18 的着丝粒远端选择了 2 个微卫星标记 D9Mit151（71.80cM）和 D9Mit322（72.53cM）；第二次选择距 D9Mit18 上游 655 Kb 处的 SNP 标记rs8254361；第三次利用网络资源（http://danio.mgh.harvard.edu/mouseMarkers/musssr.html）搜寻潜在的SSR 标记，先后在 9 号染色体的 局 部 117.000 — 119.200 Mb间选择了 35 个SSR（引物序列未显示），分别合成引物后PCR扩增；第四次随着数据库更新，在突变基因近着丝粒端选择 2 个SNP 标记rs30195705 及rs29887892。经检验，发现D9Mit151，rs8254361， NC_000075_60440_61095（P3）及rs30195705 的PCR产物或其酶切片段在D2 及B6 间呈多态性，这些标记的引物序列、PCR产物及内切酶见表 1 及图 1。每次标记筛选后均对所有F_2代小鼠的基因型进行检测并连锁分析，直到第四次标记筛选后得到了位于突变基因近着丝粒端的标记rs30195705。经对 1100 只F_2代小鼠的检测，突变基因与P3 间共出现 3 例交换，与rs30195705 间出现15 例交换，P3 与rs30195705 间共出现 18 例交换，故突变基因在距着丝粒P3（117.763Mb）与rs30195705(119.129 Mb)之间。定位结果见图 2。

2.2　确定*Plcd1* 为*snthr*$^{-1Bao}$小鼠稀毛候选基因

前述工作把突变基因在 9 号染色体上的绝对范围从 113.426 —119.332 Mb 的 5.9 Mb 缩小到117.763 —119.129 Mb 的 1.367 Mb。查询 NCBI 的Mouse Genome Resources 数据库，在 9 号染色体117.763 —119.129 Mb 间共有 21 个可能的基因或EST（图 2c），其中 10 个基因在皮肤有表达，分别是 *Itga9*、*Golga4*、*Azi2*、*Dlec1*、*Oxsr1*、*2010110K16RiK*、*Ctdspl*、*Vill*、*Plcd1*、*Acaa1b*。寻找候选基因首先针对这 10 个基因进行，随后检索，其他基因或 EST。由于 Nakamura et al (2003)制作并获得了 *Plcd1* 基因的敲除小鼠，该基因敲除小鼠产生后 8 天开始脱毛接着由于表皮增生，毛囊闭塞而

表 1　标记名称、引物及其多态性
Tab. 1　Information of markers used in this experiment

标记名称 Marker name	引物序列（5'—3'） Primer sequence　5'–3′	PCR 产物多态性 Polymorphism	内切酶 Incision enzyme
D9Mit151	F：TGGTCAAGGTGTGGTATCGA R：AAAACTCAGCATCCAATGGG	B6　116bp D2　120bp	—
rs8254361	F：GTCCTTCTTCATCGCCTTGTATTT R：TTGATTCCCTTGTCCCCTGTCCTC	D2　760bp，B6 酶切成 510 bp 及 250bp 两条带	EcoT221
NC_000075_60440_61095（P3）	F：GCAGAGGCCTTGTTTCAAAG R：CTGTCTCTTCCTCTCCTGTGC	B6　90bp D2　130bp	—
rs30195705	F：GATAAAGGCCCTCCCAGAAGA R：TCAGCGAGTGTACAGAAGCAGAC	B6　897bp，D2 酶切成 286bp 及 611bp 两条带	Msp Ⅰ

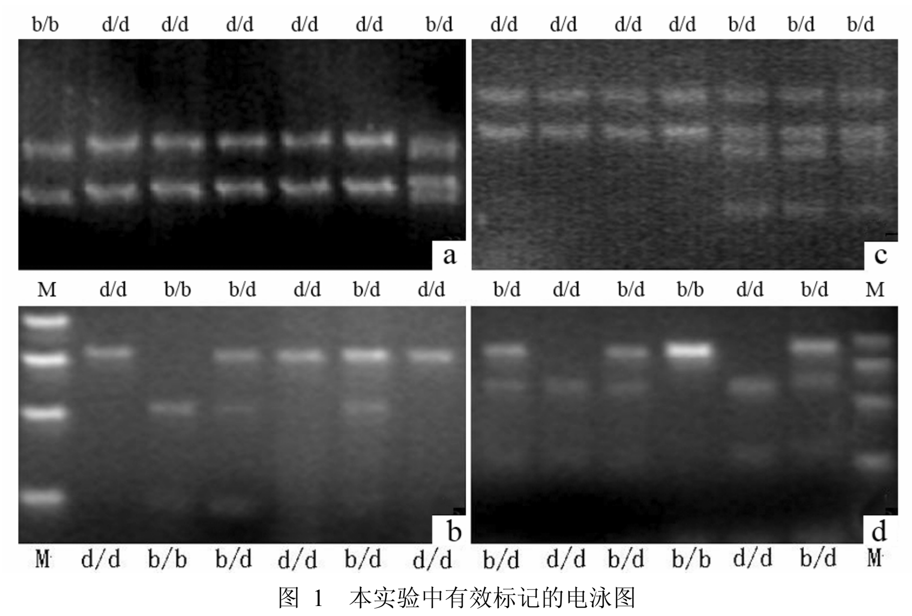


图 1 本实验中有效标记的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pictures of markers used in this experiment

a：D9Mit151 PCR 产物电泳图；b：rs8254361 PCR 产物经 EcoT221 酶切电泳图；c：新 SSR P3 PCR 产物电泳图；d：rs30195705 PCR 产物经 MspⅠ酶切电泳图。

每一泳道下方为基因型，M 为 marker。

a: the electrophoresis picture of D9Mit151; b: the rs8254361 PCR production digested by EcoT221; c: the electrophoresis picture of P3 PCR production; d: the rs30195705 PCR production digested by MspⅠ.

Letter under each lane showed the genotype of corresponding sample except M represented DNA ladder.

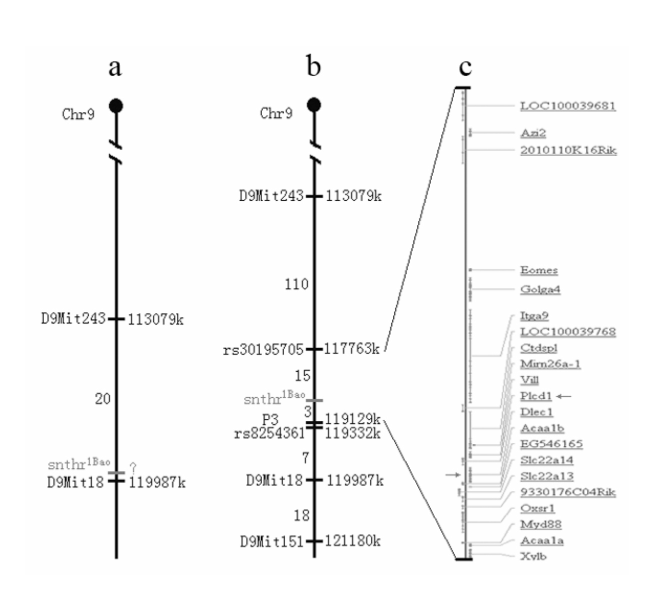


图 2 标记位置及精细定位结果

Fig. 2 Positions of markers and mutant gene

a：初步定位图；b：精确定位图；c：定位区域内的基因。

染色体左侧为标记名称，右侧为标记位置，标记之间的数字为相邻标记在 1100 例稀毛小鼠中的交换数；红色箭头示候选基因的名称及位置。

a: the primary mapping; b: the high resolution mapping; c: the genes locating in the region narrowed down.

The marker names were listed on the left side of chromosome, their distances from centromere were marked on the right side and numbers between them were the crossover cases taking place between consecutive markers. The arrow showed the candidate gene of scant hair.

导致进行性秃发，而在对其他 20 个基因的资料查询中未发现与皮肤毛发生长相关的信息。由于*Plcd1*恰好位于最可能的位置且敲除小鼠与*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠的表型非常相似，因此*Plcd1* 被确认为*snthr*$^{-1Bao}$小鼠稀毛突变的强力候选基因（图 2c）。

2.3 突变位点的鉴定

2.3.1 mRNA水平的测序鉴定 首先进行了mRNA水平的测序鉴定，以*Plcd1* 基因cDNA全长 2 270 bp为模板，分别设计PCR产物覆盖全长的引物 1 对，成功扩增D2 小鼠*Plcd1* cDNA的全长，但对*snthr*$^{-1Bao}$小鼠标本扩增失败；随后将*Plcd1* 基因cDNA分 3 段设计引物，成功扩增到D2 小鼠的 3 个片段，但来自*snthr*$^{-1Bao}$小鼠的模板虽经反复扩增均告失败。所用引物序列见表 2，D2 小鼠标本的扩增结果见图 3。

2.3.2 基因组水平的测序鉴定 *Plcd1* 有 15 个外显子，首先针对各外显子共设计了 10 对引物，D2 小鼠基本全部成功扩增，而*snthr*$^{-1Bao}$小鼠除 1、2、3 号外显子外，4 号及以后的外显子后均扩增失败（资料未显示）。随后针对*Plcd1* 3 号外显子以后的基因组序列重新设计 9 对引物，覆盖*Plcd1* 3—15 号外

表 2　*Plcd1* cDNA 扩增引物

Tab. 2　Primers for *Plcd1* cDNA

引物名称 Primer name	引物序列 5'—3' Primer sequence 5'−3'	对应 ORF 位置 Position of primer
全长引物正向 Forward primer of whole length	ATTTTGCTGAAGTGAATCACGCCG	53—76
全长引物反向 Reverse primer of whole length	TGCTCCTGGACCCCCAGAGAAGTA	2508—2531
第 1 片段正向 Forward primer of the first fragment	AGGCCGCTTGGTGATTTTGCTC	40—61
第 1 片段反向 Reverse primer of the first fragment	TAGATGATGGGTTCCTGGTTGG	1148—1169
第 2 片段正向 Forward primer of the second fragment	CCTGAGCAACTGAAGGAAAAGA	1387—1408
第 2 片段反向 Reverse primer of the second fragment	AAAGTCAACTAGGGTAGGGAGA	2583—2605
第 3 片段正向 Forward primer of the third fragment	CGGAGACCCTGTCGGTGGAGAA	779—800
第 3 片段反向 Reverse primer of the third fragment	CCAGAGGTGCATGGACTGGAG	1624—1646

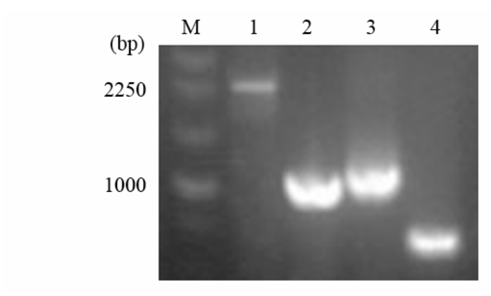


图 3　D2 小鼠 *Plcd1* cDNA 扩增结果

Fig. 3　PCR productions of the *Plcd1* cDNA from D2 mouse

1：全长 cDNA；2：第 1 片段；3：第 2 片段；4：第 3 片段；M,分子量标记。

Lane 1 showed the whole length of Plcd1; lane 2,3,4 showed 1st, 2nd, 3rd fragment; M was DNA ladder.

显子和内含子对应基因组的区域，并且针对*Plcd1*15 号外显子下游*Vill*基因设计了 5 对引物（图 4），这些引物的PCR产物理论上覆盖范围包括了*Vill*基因的 4—19 号外显子。首先逐一使用相邻的引物对进行PCR扩增，来自D2 小鼠基因组的标本基本扩增成功，而来自$snthr^{-1Bao}$小鼠的基因组标本只扩增到ar及ij段。综合前后实验结果，考虑稀毛突变为基因组局部的巨大缺失，于是采用引物b（5'-TCTTTGCATTTGGGTATGCA-3'）和引物k（5'-AGGGAGGTGGGTCTAA GGGAT-3'）PCR扩增基因组标本，结果D2 小鼠标本未扩增成功（理

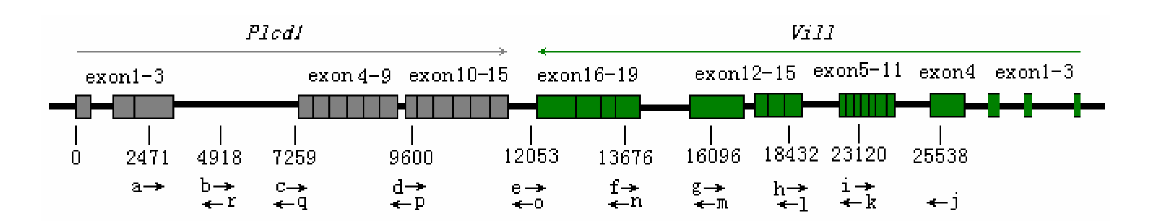


图 4　*Plcd1* 和 *Vill* 对应基因组结构及引物位置

Fig. 4　Genomic structure of *Plcd1* and *Vill* and the positions of primers

上方为基因组结构示意图；中间为从 *Plcd1* 第 1 号外显子起计数的碱基数；下方为本实验中设计的引物位置及 5'到 3'方向。

Upper: The schematic of local genomic structure; Middle: The ordinal number of base pair since the first one of Plcd1exon1; Lower: The primer positions and the arrow showing the direction of each primer from 5' to 3'.

论上太长，极难扩增），而$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠均见到清晰的 900 bp左右的单一条带（图 5a）。将稀毛小鼠PCR产物测序（图 5b），测序结果与基因组数据库比对之后发现$snthr^{-1Bao}$稀毛小鼠第 9 号染色体在距着丝粒 1 189 724 07 bp与 118 987 290 bp之间存在14 883 bp巨大缺失，这一缺失包含*Plcd1* 基因的 4 到 15 号外显子及*Vill*基因的 10—19 号外显子（图 5c）。

2.4　缺失对 *Plcd1* 及 *Vill* 的影响以及与人类基因组同源性比较

利用 MIT 网络资源预测该缺失对局部基因的

影响，将缺失前后的基因组局部序列，输入 The New GENSCAN Web Server at MIT：Identification of complete gene structures in genomic DNA 窗口（http://genes.mit.edu/GENS CAN. html），预测该缺失对局部基因组转录及剪接的影响；输出结果显示该缺失仅导致两相关基因编码蛋白质提前终止，PLCD1 仅仅正确编码了 808 个氨基酸中的前 179 个，VILL 正确编码 884 个氨基酸中的前 317 个（图 6），未出现新的融合基因。

经同源性比较，人类在第 3 号染色体短臂 3p21.3 区域对应小鼠 9 号染色体末端，该区段染色体在人和小鼠高度同源，*Plcd1*、*Vill*基因及局部其他基因的名称及位置关系一致。

3　讨 论

3.1　遗传标记与精确定位

精确定位的关键在于突变基因所在局部基因组标记的密度及F_2代动物的数量。本实验繁殖 4400 余只F_2代小鼠，选择其中的 1100 只稀毛小鼠用于精确定位，并最终将突变基因的绝对范围限定在 1.367 Mb内，定位工作的效率并不高。由于小鼠品系众多且基因组数据库已非常完善，在不同品系间进行标记筛选一般不成问题，但是本实验在精确定位过程中只做了一个交配体系，导致突变基因所在区域基因组标记的筛选相对困难，花费近一年的时间在SNP数据库更新的基础上才获得 4 个有效标记。若同时做 3 到 5 个交配体系，在不同品系间进

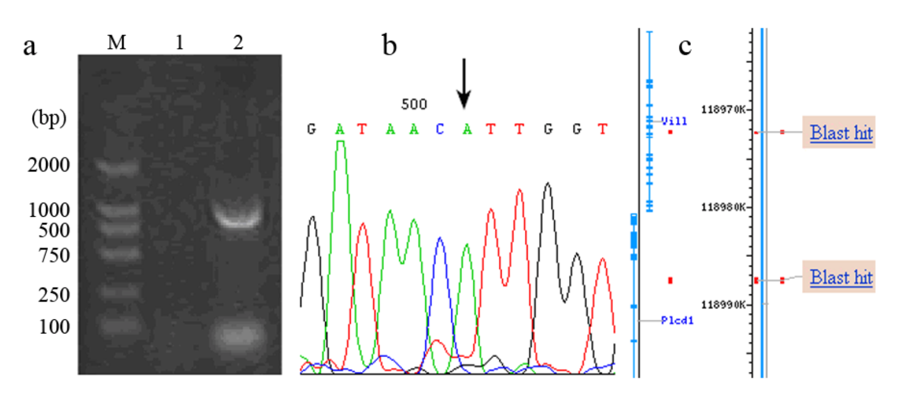


图 5　引物扩增片段、测序及序列比对结果

Fig. 5　Results of PCR, sequence and Blast

a：PCR扩增电泳图，第 1 泳道为D2 背景品系基因组DNA标本，第 2 泳道为*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠标本；b：测序图，箭头示基因组断点位置；c：测序结果与小鼠基因组序列比对结果，红色Blast hit间为缺失区。

a: the electrophoresis picture of PCR production, lane 1 and 2 were from the sample of D2 and *snthr*$^{-1Bao}$ mouse, M was DNA ladder; b: sequence result and the arrow marked the broken site; c: the blast result and the region between red bars (blast hit) was the deletion.

Plcd1: GENSCAN_predicted_peptide_2|808_aa
MQCLGVRSCRRGSVNRSRELYLQEQSRKVAALNGQRLGLQDDPDLQALLKGSQLLKVKSSSWRRERFYKLQEDCKTIWQESRKVMRSPESQL
FSIEDIQEVRMGHRTEGLEKFARDIPEDRCFSIVFKDQRNTLDLIAPSPADVQHWVQGLRKIIDRSGSMDQRQKLQQYPPGGSGSR [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
Vill: GENSCAN_predicted_peptide_1|884_aa
PGMDINQDLPAIDSHRALQIWITENLKMLPLPERAHGNFFEECCYVVLHVPQSPKATQGGFSDLHYWIGKDASAEAREAAVSFVQCLQEDLG
DQTVLHRESQGHESDCFHSYFHPGVIYRKGGRDSALKFAETNMYNVQRLLHIRGRKHVSATEVALSWNSFNKGDIFLLDLGKVMIQWNGPKA
SISEKARALTLTCNLRDRERGGRAQIAVVDAENEATNLLRIMEAVLGCRSGSLCPSVPSNSVSQLQKANVRLYHVCEKGTDLVVQELATRPL
TQDLLQEDGCYLLDQGGFKIYMWQGRKSSPQEKKAALSRAV [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

图 6　基因组缺失导致的 PLCD1 与 VILL 氨基酸的改变

Fig. 6　Amino acids changes of PLCD1 and VILL caused by the genomic deletion

黑色斜体示缺失部分 (The black italic parts meant the deletion of *snthr*$^{-1Bao}$)。

行标记筛选，标记筛选就变得比较简单。

本实验中我们分别应用了微卫星、潜在SSR（一种与微卫星相同的标记形式）筛查及 SNP 三种标记；微卫星是非常成熟的标记形式，在基因定位中运用很广泛(Feng et al, 2007)。通过计算机在基因组数据库中寻找可能的 SSR 这一方法的实际运用不多（http://danio.mg h.harvard.edu/mouseMarkers/musssr.html），本实验先后在 9 号染色体的局部距着丝粒 117.000—119.200 Mb间选择了 35 个SSR，结果只筛选到 1 个在D2 和B_6间呈多态性的位点，尽管效率低，但不失是一种值得尝试的方法。基于SNP的酶切扩增多态性序列（c1eaved amplified polymorphic sequences，CAPS）是一种极好的标记形式，在其他物种的鉴定中用得很多，但用于小鼠定位尚不多见(Liu, et al; Feng et al, 2007; Orr et al, 2008)。这是一种高效的寻找基因组标记的方法，即使某些SNP无合适的内切酶，将覆盖SNP位点的PCR产物直接测序也可鉴定基因型。该标记系统的覆盖密度大，平均约每 1000 个碱基对就会有一个SNP位点，因而在基因定位的研究中有着其它标记系统不可比拟的优越性。

实验过程中，每次在得到新的标记后，都将1100 个标本全部进行基因型鉴定，这个过程并非必要，只要将突变基因附近产生交换的标本进行鉴定即可，无需将所有F_2代小鼠全部进行基因型鉴定。本实验的另外一个教训是，未能充分利用巨大数量的F_2代小鼠（超过 4400 只），首先是我们仅仅使用了其中稀毛小鼠用于定位，实际上表型正常的F_2代小鼠也可部分提供交换信息；其次，若仅仅根据初步定位用的基因组标记D9Mit18 和D9mit243（间距 5.9 Mb），基于这些巨量F_2代小鼠推算出来突变基因的位置恰好就是 *Plcd1*，但是考虑染色体交换过程可能存在不易交换的“冷点”(Schuler et al, 1997), 避免依据相对位置给鉴定工作带来麻烦，未大胆尝试克隆鉴定突变位点，也因此耗费了许多精力和时间。

3.2　稀毛候选基因的提出与鉴定

snthr^{-1Bao}稀毛小鼠的皮肤病变出现在1—2 周龄间，随年龄增加而加重，病变主要表现为表皮棘细胞层增生增厚，表皮角化过度，部分毛发在皮内卷曲、折断不能穿出表皮层，毛囊数量并无显著减少（Wu et al，2008）。在精确定位后分析局部所有基因功能的过程中，我们发现Nakamura et al (2003)年制作并获得了*Plcd1* 的敲除小鼠，该小鼠 8 日龄后开始脱毛，接着由于表皮增生、毛管闭塞、皮脂腺增生而导致进行性秃发同时伴异常囊肿形成。正是基于Nakamura et al (2003)的工作及对稀毛基因的精确定位，我们确认*Plcd1* 为候选基因。最终经过细致的工作鉴定出基因组上 14883 bp的巨大缺失。最近，Runkel et al (2008)鉴定出另一个稀毛伴雄性不育小鼠的突变基础为同一区域内 243 kb更大缺失，缺失涉及*Plcd1*，*Vill, Dlec1, Acaa1b, Ctdspl* 和 *Slc22a14* 六个基因，但作者通过遗传互补实验（该突变不能与*Plcd1*$^{-/-}$基因互补）证明了这个小鼠的稀毛就是*Plcd1* 缺失所致，而其他基因所表现出来的异常表型为不育。尽管*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠基因组缺失涉及*Plcd1 和Vill*，但综合现有资料，有理由认为*snthr*$^{-1Bao}$小鼠稀毛表型主要和*Plcd1* 基因的功能缺失相关。

Plcd1，即phospholipase C-δ1，磷脂酶C-δ1，属于磷脂酶C（PLC）同工酶家族。PLC是磷酸肌醇信号转导途径中的一个关键酶，当机体内激素、神经递质、生长因子等分子激活其受体时，导致PLC水解4，5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP2）产生两个第二信使：甘油二酯（DG）和1，4，5-三磷酸肌醇（IP3）。DG调节蛋白激酶C（protein kinase C，PKC）的活性，而IP3引起胞内Ca^{2+}动员。在哺乳动物，已确认有12种PLC同工酶，根据序列的同源性和活性机制，PLC分为β、γ、δ、ε和ζ 五种类型，其中PLC-δ又有$δ_1$-$δ_4$共4种亚型(Saunders et al, 2002)。PLC分子为单链结构，每组PLC同工酶包括保守结构域和不同亚型间的特殊结构域。保守结构域包括C2结构域、EF手型结构域、PH结构域和两个高度保守的催化结构域X区和Y区组成(Saunders et al, 2002; Okada et al. 2002)（图7）。PLCD1在许多组织中丰富表达(Suh et al, 1988; Lee et al, 1999)，是PLC中对钙最敏感的类型(Allen et al, 1997)，新近研究表明Gi/Go蛋白偶联受体能激活PLCD1，而其活化由Ca^{2+}介导的(Murthy et al, 2004)。有趣的是，在*snthr*$^{-1Bao}$稀毛小鼠中与*Plcd1*同时部分缺失的VILL基因作为ACTIN结合蛋白，也和Ca^{2+}信号及浓度有关，不能排除两个基因之间存在相关。

我们曾经报道过ENU诱变过程中同时获得两种稀毛突变小鼠(Mao et al, 2004, 2005)，但是对这

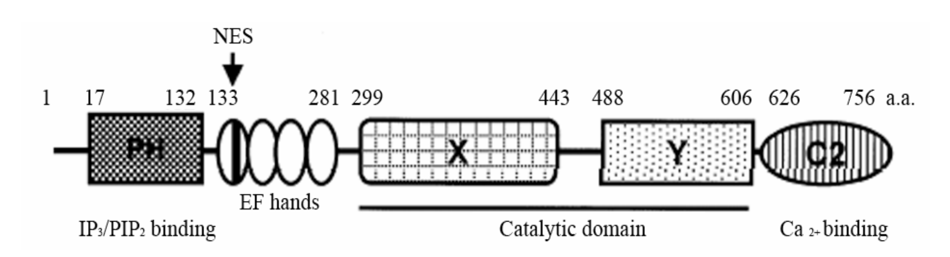


图 7 *Plcd1*结构示意图（引自Okada et al, 2002）

Fig. 7 A schematic structure of *Plcd1* (Cited from Okada et al, 2002)

PH：PH 结构域；EF hand：EF 手型结构域；X,Y：催化结构域；C2：C2 结构域；NES：细胞核输出序列。数字表示氨基酸位数。

PH, EF, X, Y and C2 in the PLCδ1 structure denote the PH domain, EF hand motifs, the catalytic X and Y domain, and C2 domain, respectively. The NES corresponds to amino acid residues 164–177 in the EF-hand domain.

两种稀毛小鼠突变基因的定位、遗传互补实验及最终鉴定结果显示，他们是同一种突变（资料未显示）。结合ENU诱变为单碱基突变的特点(Balling et al, 2001)及实验记录的追踪，我们发现这两种小鼠属于不同处理雄鼠的后代。这个结果说明，这一基因组缺失在ENU诱变小鼠之前就已经出现，只是恰好在诱变过程中被发现，并非ENU诱变的效应。

3.3 *snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠的价值

小鼠毛囊的发育遵循生长（anagen）、衰退（catagen）、休眠（telogen）和脱落（exogen）的生长周期（hair growth cycle）(Stenn et al, 2001)。Runkel et al (2008)证实*Plcd1*缺失导致小鼠被毛稀疏是由于毛乳头细胞的早期凋亡，毛囊过早由生长期转入衰退期造成的。这一观察结果与我们先前的组织病理学研究非常相似，即在生长及衰退期的皮肤组织切片上，稀毛小鼠毛囊的数量并无显著变化(Wu et al, 2008)。我们同时发现由于皮肤过度角化，部分毛发不能穿出表皮、在皮内折断阻生，导致无菌性炎症并疤痕形成。Ichinohe et al (2007)认为*Plcd1$^{-/-}$*小鼠被毛稀疏是由于皮下毛囊周围炎症细胞浸润造成，并且认为*Plcd1*功能缺失是炎症发生的直接原因。我们认为不能排除表皮角化导致毛发阻生并折断进而导致炎症的可能性。如果能够确认*Plcd1*缺失确实是真皮下炎症的直接原因，由于这一病变与人类寻常型银屑病的病理变化十分类似，*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠或*Plcd1$^{-/-}$*小鼠将可能是人类牛皮癣的很好模型，但仍需要在基因水平上进一步确认其模型价值。在确认皮肤角化、炎症细胞浸润、稀毛与*Plcd1*基因的相关性之后，*Plcd1*功能缺失的稀毛小鼠为人类类似疾病的深入研究提供了线索，确认人类同源疾病将为期不远。

*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠对于*Plcd1*等相关基因的功能研究十分重要。Nakamura et al (2008)通过对Plcd1$^{-/-}$小鼠的研究发现*Plcd1*基因很可能是裸基因的下游基因，但是*snthr^{-1Bao}*稀毛小鼠的胸腺目前未见异常，普通环境可以存活，这说明了裸基因对毛发稀疏的作用和对免疫系统的调节可能通过不同的途径实现。Nakamura et al (2005)发现*Plcd1*和*Plcd3*双敲除小鼠导致胚胎致死，说明这两个基因对于小鼠胚胎发育有重要作用。还有报道称*Plcd1*还在Alzheimer's病和原发性高血压病中起作用(Shimohama et al, 1991; Kato et al, 1992)。我们还发现一个有趣的线索，在定位用F_2小鼠中，突变小鼠毛发稀疏的程度因遗传背景改变有显著的差别，表现为数量性状的特征，通过数量遗传学手段，我们发现基因组上存在4个调节基因能够作用于*Plcd1*，进而改变稀毛的程度。相关工作已整理成文待发表，这将是首次定位与毛发稀疏数量性状相关的基因座。尽管如此，先前的研究除了对PLCD1的结构了解得比较清楚外(Saunders et al, 2002)，对其时空表达、调节机制及生理功能等了解得很少，而*snthr^{-1Bao}*等稀毛小鼠为*Plcd1*及其相关基因的功能研究提供了新的材料。

致谢：感谢 The Jackson Lab 的 Aaron Brown 博士推荐并指导使用网络资源筛选潜在的 SSR。

参考文献：

Allen V, Swigart P, Cheung R, Cockcroft S, Katan M. 1997. Regulation of inositol lipid-specific phospholipasecd by changes in Ca2+ ion concentrations[J]. *Biochem J*, **327**: 545-552.

Balling R. 2001. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet,* **2**: 463-492.

Feng SJ, Wang L, Ma JH, Lin F, Pan QH. 2007. The New non-toxic gene *AvrPi7* of *Magnaporthe oryzae* genetic and physical mapping[J]. *Chinese Science Bulletin*，**52**（3）：283-290. [冯淑杰，王 玲，马俊红，林 菲，潘庆华. 2007. 稻瘟病菌新无毒基因 AvrPi7 的遗传及物理作图. 科学通报，**52**（3）：283-290.]

Flanagan SP. 1966. “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse[J]. *Genet Res*, **8**: 295-309.

Frank J, Pignata C, Panteleyev AA,Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita jM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette J, Christiano AM. 1999. Exposing the human nude phenotype[J]. *Nature,* **398**:473-474.

Ichinohe M; Nakamura Y; Sai K; Nakahara M; Yamaguchi H; Fukami K. 2007. Lack of phospholipase C-delta1 induces skin inflammation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**(4): 912-918.

Joseph S, Russell DW. 2002. Molecular cloning. a labortory manual (third edition)[M]. Beijing: Science Press，479-483.

Kato H, Shibasaki F, Takenawa T. 1992. Activation of phospholipase Cd in the aor tas of spontaneously hypertensive rats[J]. *J Biol Chem,* **267**: 6483-6487.

Lee WK, Kim JK, Seo MS, Cha JH, Lee KJ, Rha HK, Min DS, Jo YH, Lee KH. 1999. Molecular cloning and expressionanalysis of a mouse phospholipase C-d1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**(2): 393-399.

Liu ZX, Liu YK,Shan QC. 2008. CAPs marker-assisted selection for cold tolerance gene at the booting stage in rice[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (*Natural Sciences*), **34**（2）：117-131.[刘之熙, 刘云开, 詹庆才. 2008. 水稻孕穗期耐冷基因的 CAPs 标记辅助选择. 湖南农业大学学报：自然科学版，**34**（2）：117-131.]

Mao HH, Wu BJ, XU ZF, Shao YX, Chen B, Li HD. 2004. The new coat mutant mice induced by ethylnitrosourea [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **50**(3): 442-446. [茅慧华, 吴宝金, 薛整风, 邵义祥, 陈 兵, 李厚达. 2004. 乙烷基亚硝基脲诱变获得两种新的被毛突变小鼠. 动物学报, **50**(3): 442-446.]

Mao HH, Shao YX, Wu BJ,XU ZF, Chen B, Li HD. 2005. Mapping the mutant genes of two new scant hair mice[J]. *Acta Zoologica Sinica*，**51** (2): 294-298. [茅慧华, 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 陈 兵, 李厚达. 2005. 两例新的稀毛小鼠突变基因的染色体定位. 动物学报，**51** (2): 294-298.]

Murthy KS, Zhou H, Huang J, Pentyala SN. 2004. Activation of PLC-delta1 by Gi/ o-coupled receptor agonists[J]. *Am J Physiol Cell Phy siol,* **287**(6): 1679-1657.

Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa S, Ha shimoto K, Yoshida N, Takenawa T. 2003. Phospholipase Cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment[J]. *EMBO J,* **22**(12): 2981-2991.

Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M,; Matsuura H, Fujiwara T, Igarashi T, Nakahara M, Yamaguchi H, Yasugi S, Takenawa T, Fukami K. 2008. Phospholipase C-delta1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development[J]. *FASEB J,* **22**(3): 841-849.

Nakamura Y, Hamada Y, Fujiwara T, Enomoto H, Hiroe T, Tanaka S, Nose M, Nakahara M, Yoshida N, Takenawa T, Fukami K. 2005. Phospholipase C-delta1 and -delt a3 are essential in the trophoblast for placental development[J]. *Mol Cell Biol,* **25**(24): 10979-10988.

Okada M, Fujii M, Yamaga M, Sugimoto H, Sadano H, Osumi T, Kamata H, Hirata H, Yagisawa H. 2002. Carboxyl-terminal basic amino acids in the X domain are essential for the nuclear import of phospholipase Cδ1[J]. *Genes Cells,* **7**(9): 985-996.

Orr W, Molnar SJ. 2008. Development of PCR-based SCAR and CAPS markers linked to beta-glucan and protein content QTL regions in oat[J]. *Genome*, **51**(6): 4 21-425.

Runkel F, Aubin I, Simon-Chazottes D, Büssow H, Stingl R, Miething A, Fukami K, Nakamura Y, Guénet JL, Franz T. 2008. Alopecia and male infertility in oligotriche mutant mice are caused by a deletion on distal chromosome 9[J]. *Mamm Genome,* **19**:691-702.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of $Ca^{(2+)}$ oscillations in eggs and embryo development. [J]. *Development,* **129**: 3533-3544.

Schuler GD. 1997. Sequence mapping by electronic PCR[J]. *Genome Research,* **7**(5):541- 550.

Shimohama S, Homma Y, Suenaga T, Fujimoto S, Taniguchi T, Araki W, Yamaoka Y, Takenawa T, Kimura J. 1991. Aberrant accumulation of phospholipase C-d in Alzheimer brains[J]. *Am J Pathol*, **139**: 737-742.

Stenn KS, Paus R. 2001. Controls of Hair Follicle Cycling[J]. *Physiol Rev,* **81**: 449-494.

Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG. 1988. Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain[J]. *J Biol Chem*, **263**: 14497-14504.

Sundberg JP, Price VH, King LE. 1999. The “hairless” gene in mouse and man[J]. *Arch Dermatol,* **135**:718-720.

Sundberg JP, King LE, Bascom C. 2001. Animal models for male pattern (androgenic) alopecia[J]. *Eur J Dermatol,* **11**:321-325.

Wu BJ, Shao YX, Mao HH, Tang D, Liu J, Xue ZF, Li HD. 2004. Two kinds of ENU-induced scant hair mice and chromosome locations of the mutant genes[J]. *Journal of Dermatological Science,* **36**:149-156.

Wu BJ, Mao HH, Yin J, Shao YX, XU ZF, Chen B, Li HD. 2008. Pathological developme nt in the skin of scant hair mouse, snthr^{-1Bao}[J].*Chinese Journal of Anatomy*, **31**(2) :181-184. [吴宝金, 茅慧华, 殷 俊, 陈 兵, 薛整风, 李厚达. 2008. snthr-1Bao稀毛小鼠皮肤组织的病理变化. 解剖学杂志, **31**(2): 181-184.]

Zlotogorski A, Panteleyev AA, Aita VM, Christiano AM. 2001. Clinical and molecular diagnostic criteria of congenital atrichia with papular lesions[J]. *J Invest Dermatol,* **117**: 1162-1165.

中国动物学会第十六届会员代表大会暨学术讨论会第二轮通知 2009-5-22

省、自治区、直辖市动物学会、学会各分会、专业委员会及学会会员代表：

2009年是中国动物学会成立75周年，理事会决定于2009年10月19—22日在重庆市召开中国动物学会第十六届会员代表大会暨学术讨论会，会期4天(包括1天报到)。

主办单位：中国动物学会

承办单位：西南大学、重庆动物学会、淡水生物生殖与发育教育部重点实验室

一、会议主要内容

1．学术交流

（1）脊椎动物的进化与生态适应（由兽类学分会、鸟类学分会、两栖爬行动物学分会和鱼类学分会联合组织）；

（2）生殖生物学、发育生物学及比较内分泌学前沿研讨（由生殖生物学分会、比较内分泌学专业委员会和发育生物学专业委员会联合组织）；

（3）生物多样性与寄生虫与宿主的相互作用及原生与无脊椎动物进化、生态与利用（由寄生虫学专业委员会、原生动物学分会、贝类学分会、甲壳动物学分会及蛛形学专业委员会联合组织）；

（4）动物学教学和动物学科普问题研讨（由学会教学工作组、科普工作组组织）；

（5）动物学博士生论坛（由西南大学、中国动物学会主办）。拟资助100名在读动物学博士生，欢迎踊跃提交论文摘要和论文。经审查符合条件，将免会议注册费并免费提供参会期间的住宿（限3人一间）。详情见西南大学动物学博士生论坛实施方案、西南大学研究生院和生命科学学院网页http://smkxxy.swu.edu.cn。

2．修改中国动物学会章程

3．选举中国动物学会第十六届理事会理事，召开第一次理事会会议，选举常务理事，召开第一次常务理事会会议，选举正、副理事长、常务理事、秘书长

4．召开中国动物学会各分会、专业委员会主任委员、负责人、秘书长及各省、自治区、直辖市动物学会理事长、秘书长联席会议，研讨学会今后工作思路与设想。

二、会议论文摘要征集

学会将在会前刊印中国动物学会第十六届会员代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编，为内部发行。现向广大会员、动物学科技工作者征集论文摘要，同时向参加动物学博士生论坛（由西南大学、中国动物学会主办）征集论文摘要和论文全文，论文及论文摘要均不收取审稿费及版面费。

1．论文摘要格式要求（详见http://www.czs.ioz.ac.cn）

2．论文摘要及论文提交方式及截止日期

（1）论文摘要请通过中国动物学会主页（http://www.czs.ioz.ac.cn）左侧菜单栏“学术会议系统”提交（详见附件1）或发送至中国动物学会秘书处czs@ioz.ac.cn电子信箱，截止时间为2009年8月30日。

（2）参加“动物学博士生论坛”（由西南大学、中国动物学会主办）并提供论文全文PDF者，除可以通过中国动物学会主页（http://www.czs.ioz.ac.cn）左侧菜单栏“学术会议系统”提交（详见附件1），也可通过jinll@swu.edu.cn，zygjin@126.com电子信箱提交，截止时间为2009年9月30日；学术报告PPT文件请发至jinll@swu.edu.cn；zygjin@126.com，截止时间为2009年10月15日。

(下转第239页)